



第一回の出願日	出願番号
1977年9月9日	第132117号
第二回の出願日	出願番号
1977年9月9日	第132117号
第三回の出願日	出願番号
1977年9月9日	第132117号

(¥2,000)

特許願 (特許法第38条ただし書  
の規定による特許出願)

特許庁長官 殿

昭和47年9月7日

1. 発明の名称

コウソデンキ  
酵素電極

2. 特許請求の範囲に記載された発明の数 12

3. 発明者

居 所 スイス国テルウィル、タラッセルシュトラッセ  
氏 名 ボルフガング、ミント (ほか2名)

4. 特許出願人

住 所 スイス国バーゼル、クレンツアヒエルシュトラッセ  
124-184番  
名 称 E.F. ホフマン・ラ・ロシュ、ウント、コンパニ  
アクチエンゲゼルシャフト

(代表者) クルト、ネツセルボツシュ  
(同) テオドール、ホール

国 籍 スイス国 (ほか2名)

5. 代理人

居 所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビルディング331  
氏 名 (3114) 弁護士 浅村 成久 (ほか3名)



方式  
審査

47 089201

明 細 書

1. 発明の名称

酵素電極

2. 特許請求の範囲

- (1) 電気化学的感覚器、それと接触状態にあり酵素および受容体を含む層、該層を覆う半透過性の膜を特徴とする、中間代謝で生ずる物質の濃度を測定するための酵素電極。
- (2) 膜が受容体を含む貯蔵部と連絡していることを特徴とする第1項に記載の酵素電極。
- (3) 受容体が部分的に未溶解の形で存在することを特徴とする第1項に記載の酵素電極。
- (4) 受容体が溶解形で貯蔵部に含まれることを特徴とする第2項に記載の酵素電極。
- (5) 受容体が多孔質材料内に含まれることを特徴とする第1項、第2項、および第4項の何れかに記載の酵素電極。
- (6) 受容体がレドックス染料、難溶性ヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩またはモノ置換p-ベンゾキノンであることを特徴とする前記各項の何れかに記載

の酵素電極。

- (7) グルコース基質に対する受容体が2,6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム、メチレンブルー、ピオシアニンペルクロレート、またはp-トルキノンであることを特徴とする第6項に記載の酵素電極。
- (8) L-乳酸基質に対する受容体がヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸クロム-(Ⅲ)-ヘキサアンチピリン、フェノールブルーまたはチオエンであることを特徴とする第6項に記載の酵素電極。
- (9) 電気化学的感覚器の表面が未溶解受容体を含むか所を有することを特徴とする第3項に記載の酵素電極。
- (10) 膜が再生セルロース、三酢酸セルロースまたはポリビニルアルコールからなることを特徴とする前記各項に記載の酵素電極。
- (11) 膜が支持材と半透過性被覆からなることを特徴とする第10項に記載の酵素電極。
- (12) 膜が他の化合物と組み合わせられるか、電荷を帯びることを特徴とする第10項に記載の酵素電極。

①9 日本国特許庁

公開特許公報

①特開昭 48-37187

④3公開日 昭48.(1973)6.1

②1特願昭 47-89201

②2出願日 昭47.(1972)9.7

審査請求 未請求 (全5頁)

庁内整理番号

⑤2日本分類

7268 41

113 D13

7003 41

113 E6

僅。

### 3 発明の詳細な説明

本発明は中間代謝で生ずる物質の濃度、特にグルコース濃度を決定するための酵素電極に関する。

従来の酵素電極は普通には次の原理に基づいてつくられる。それらは電気化学的感覚器（例えば、白金電極、ガラス電極など）、半透過性の膜、酵素を含む中間層から成立つ。膜を通して拡散し酵素層の領域において酵素反応に入る基質について測定を行なう。電気化学的に活性な反応体あるいは反応生成物の濃度が電気化学的感覚器によつて同時に測定される。測定された濃度は被検溶液中の基質濃度と関連し、この関係は系の目盛定めによつて決定される。

酵素電極を使用する従来の測定法は、基質と酵素以外に第三の特別な反応体、例えば補酵素、が酵素反応の参加者であるかないかによつて二つの範ちゆうに分けられる。

例えば、触媒として作用する酵素ウレアーゼによつて尿素をアンモニウムと  $\text{CO}_2$  に分解するとき

3

酵素グルコースオキシダーゼを用いるグルコース測定の場合には、この酵素に対する天然の受容体である酸素の使用に基く幾つかの方法が知られている。例えば、酵素層と密着させたクラーク電極を用いて、酵素反応中の酸素消費を測定することが提案された。しかし、この種の測定は、電極周辺の酸素分圧に著しく依存し、従つて、酸素分圧が変化する生理学的溶液においてごく限られた用途しかない。それ故、不活性化された酵素の層によつてできるだけ同じ様に被覆された第二のクラーク電極を使用することにより、酸素分圧の変動によつて起こる誤差を補正することが提唱されたが、そのような測定法は実験的に非常に複雑であり、従つて、日常の測定に対する臨床的使用には不適當である。

別の可能性は、酸素の存在でグルコースの酵素的酸化の際に生成する  $\text{H}_2\text{O}_2$  を、白金電極で陽極酸化することである。痕跡量で存在するカタラーゼによる  $\text{H}_2\text{O}_2$  の分解のために、この酸化を定量的に行なうことは困難であり、従つて、その測定は

特開 昭48-37187.21

にはこの種の第三の反応体を必要としない。尿素に対する酵素電極においては、分解の結果として遊離するアンモニウムイオンが該イオンに反応する膜電極によつて直接測定される。

これと対照区別して、本発明酵素電極は最初の範ちゆうに属する系、更に詳しく言えば、酵素が有機化合物の酸化、例えばグルコースからグルコン酸への酸化、または乳酸からピルビン酸への酸化を触媒するものである。一般に、この種の酸化は他の物質の還元と対をなし、後者は普通には受容体と呼ばれる。この種の対をなした過程は次の実験反応式により記述される：



（ただし、S および P は酵素反応の基質と生成物を指し、 $A_{\text{Ox}}$  および  $A_{\text{Red}}$  は受容体の酸化形および還元形を指し、そして E は酵素を表わす）

本発明酵素電極の原理は、受容体の還元形または酸化形、 $A_{\text{Ox}}$  または  $A_{\text{Red}}$  の濃度を電気化学的に測定し、このようにして、被検溶液中の基質の濃度の尺度を得ることである。

4

決定困難な誤差を伴う。特別な注意を払うのであれば、この測定も上記の場合と同様に電極の周辺における酸素分圧に依存する。それ故酸素分圧を一定に保つために、酵素層の若干を疎水性酸素透過性の膜と接触させることが提唱された。酸素ガスはこの疎水性膜の裏に沿つて通され、膜を通して酵素層に拡散し、その酸素分圧を一定のレベルに保つ。しかし、このような電極構成は非常に複雑であり、そのため日常測定に対する臨床的使用には適さない。この系の複雑さはまた生体内測定（例えば血管内での使用）に使うのに必要な小型化を不可能にする。

グルコース測定に対する酵素電極において、受容体としての酸素の使用に関係したこれらすべての難点を回避するために、試験溶液中に導入される他の受容体、例えば p-ベンゾキノンまたはヘキサシアノ鉄酸塩（Ⅲ）を使用することも既に提案されている。しかしこれの欠点は、試験溶液、例えば血液試料、を測定前に該試薬の特定量と混合しなければならず、そしてこれが更に労力を必

5

6

受とすることである。この方法も生体内測定に原理上不適当である。

本発明の目的は、公知の酵素電極の欠点をもたず、グルコースの測定に非常に適した酵素電極を提供することにある。

本発明によると、電気化学的感覚器、それと接触して酵素と受容体とを含む膜、および隔膜を覆う半透過性の膜から本質的に成立つ上記種類の酵素電極によつてこの問題が解決される。都合のよいことに、受容体は主として固体未溶解形で膜と電気化学的感覚器との間に含まれている。このようにして、酵素層における未溶解受容体の濃度は、比較的長時間にわたり酵素反応に十分な値に留まる。もしこのような過剰の受容体が未溶解形で存在しないならば、最初に酵素層へ加えられた或量の溶解物質が膜を通つて試験溶液中に拡散するために短時間のうちに失われ、従つて、酵素電極が働けなくなるであろう。未溶解形の存在は、膜からの拡散による損失量を新しく溶けた物質によつて補う効果をもつ。定常状態下で酵

7

する。

電極からの受容体の拡散はごくゆっくり起こることも確かめる。更に詳しくいえば、出て来る量が生体内測定に対し毒性の限界より下に留まらなければならない。

式(ノ)におけるように酵素反応との結合が適度論的に可能である各種の公知の有機および無機レドックス系が受容体として使用できる。更に詳しく言えば、グルコース電極の場合、競争反応として起こる酸素の還元と比較して、受容体の還元が充分迅速に起こるべきことが大切である。そうしてこそはじめて酸素の妨害が除かれる。

受容体の還元形は安定でなければならず、定量的な電解再酸化が可能でなければならない。

受容体はまた必要な溶解度を有しなければならない。過度の溶解度の場合には、溶解速度を下げるために、従つて、酵素層中の受容体濃度を下げるために、結合剤、例えばポリビニルアルコールまたはポリスチレン、を用いるか、マイクロカプセル化を用いる。

9

素層内にある受容体濃度は、主として受容体の溶解度、その溶解速度、そして受容体に対する膜の透過性によつて決まる。

与えられた酵素電極に対する至適条件を確保するために、これら三つの可変因子を互に実質的に独立して選ぶことが可能なことが非常に有利であることが見出された。

酵素層中に必要な受容体濃度を長時間にわたり維持する別の可能性は、酵素層と連絡し受容体を溶解形で含む貯蔵部を設けることである。この貯蔵部は、溶解した受容体を受けとるため多孔質材料、例えば重合体、を含むのが有利である。溶解受容体はまた凝化形で貯蔵部に貯えることもできる。例えば、次のようにして最適条件が得られる。

酵素層中の受容体濃度は、関連した酵素反応に最適の範囲にある。過度の濃度は酵素反応を妨げることがあり、一方、不十分な受容体濃度は低い基質濃度においても電極感度の飽和を起こす。

上で述べたように、酵素層中の受容体濃度が可能な最も長い時間にわたり維持されるように注意

8

受容体として適した物質の例は、或種のレドックス染料、難溶性ヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩、あるいはキノン、更に詳しくはモノ塩換p-ベンゾキノンである。

グルコース基質に対して非常に適した受容体は、例えば、2,6-ジクロロフェノールインドフェノールナトリウム、メチレンブルーおよび過塩素酸ピオシアニンである。例えば、クロム(Ⅲ)-ヘキサアンチピリンヘキサシアノ鉄(Ⅲ)酸塩、フェノールブルー、またはチオニンは、L-乳酸基質に対する受容体として特に適している。

還元された受容体の再酸化は電流計により測定される。測定された電流は基質濃度と関係がある。理想の場合、この関係は直線的である。固体電極、例えば白金、が電気化学的感覚器として適している。

半透過性の膜は、次の必要条件を満足しなければならない。これは、酵素に対して不透過性でなければならない、また基質に対するその透過性は、測定された電流と試験溶液中の基質濃度との間に

10

直線関係を得るために低い値に保たねばならない。低透過性の膜の使用により、低基質濃度範囲内の検量線が酵素層中の酵素濃度に無関係になることを確実にすることも可能である。これは時間が経つにつれて或る限界内での酵素および活性の低下の結果として検量線のドリフトを回避する。

基質に対して低い膜透過性が要求されるにも拘らず、基質濃度の変動に対し短い酵素電極レスポンス時間を得るために、膜の厚さおよび基質に対する膜の分配係数は小さくなければならない。一方、基質に対する膜の拡散係数は最大でなければならない。そしてこれは膜理論と一致する。

半透過性膜に通した材料は、それ故、再生セルロース、酢酸セルロース（種々な加水分解度）、あるいはポリビニルアルコールである。特殊な要求により、膜は種々な方法で組み合わせたり、電荷を帯びたり、あるいは他の化合物と共重合させたり（特に適当な担体を被覆することによつて）することができる。

グルコース定量用酵素電極ならびにこの電極を

/ 1

れた液（例えば全血、血清、血漿、尿など）中に浸す。酵素電極の白金円筒を電圧源（分極電圧300ないし400 mV）および電流計を経て標準電極（例えば塩化銀電極）につなぐ。膜により5-15分のレスポンス時間の後、グルコース濃度に比例した電流の最終のふれ95%が得られ、比例関係は約600  $\mu$ g/100 mlのグルコース濃度（正常血糖含量90  $\mu$ g/100 ml）まで得られる。

500  $\mu$ g/100 mlのグルコース濃度に対して単位時間当りのこの電極の安定性は60時間以上である。生体内測定に対してこの電極の小型化は技術的に容易に可能である。この場合、測定値に及ぼす温度変動の影響を補償することができるように、温度測定のためサーミスターが組み入れられる。当然のことながら、他の基質、例えばL-乳酸は相当する酵素電極によつて測定できる。例えば、L-乳酸の測定に対しては、用いる酵素はL-ラクトートデヒドロゲナーゼ（チトクローム $\text{P}_2$ ）であり、受容体はクロム（Ⅲ）ヘキサアンピリン-ヘキサシアノ鉄（Ⅲ）酸塩である。/ な

/ 3

用いて実行できる測定を、本発明の代表的な具体例として、添付図面を参照しつつ以下に述べることにする。

ホルダーとして用いた円筒状プラスチックブロック1の一端の面は、環状の突出部により包囲された円筒状のおり所を有する。白金円筒2がこのおり所にとりつけられ、電気化学的感覚器として働く。連結線3がプラスチックブロック1を通過して白金円筒から引き出され、普通の電流計の接続に使われる。白金円筒の表面は、突出部のへりの約0.2 mm下にあり、受容体（この場合には2,6-ジクロロインドフェノールナトリウム）を受け入れるおり所を有する。緩衝溶液に溶かすか、または担体材料上に固定された酵素グルコースオキシダーゼは白金円筒の表面と膜との間の空間に位置する。再生セルロースの膜4は留め輪5により突出部のへり、および突出部の外側に位置したゴムO-リング7に対して押し付けられ、接合は金属ピン6およびねじふた8により維持される。

測定の目的に対しては、この電極を温度調節さ

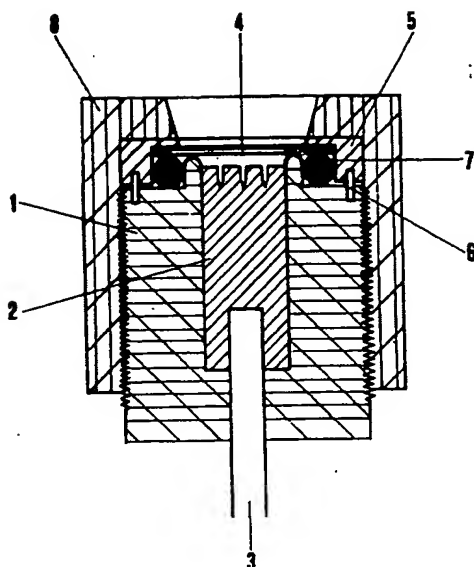
/ 2

いし3分のレスポンス時間の後（膜に左右される）、L-乳酸濃度に比例した電流の最終のふれ95%が得られ、L-乳酸濃度/50  $\mu$ g/100 ml（正常な血中L-乳酸含量は7  $\mu$ g/100 ml）まで比例関係が存在する。単位時間当りのこの電極の安定性は、130  $\mu$ g/100 mlのL-乳酸濃度に対し少なくとも5時間である。

4 図面の簡単な説明

添付図面は本発明酵素電極の図解である。

代理人 浅 村 成 久  
外 3 名



## 手続補正書(自発)

昭和47年11月9日

特許庁長官殿

## 1. 事件の表示

昭和47年特許願第 89201 号

## 2. 発明の名称

摩擦素電極

## 3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所  
氏名  
(名称) エフ、ホフマン、ラ、ロシュ、ウント、コンパニー  
アクチエンゲゼルシャフト

## 4. 代理人

住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビルディング 331  
電話 (211) 3651 (代表) 久津野  
氏名 (3114) 浅村 成久 谷田  
成士

## 5. 補正命令の日付

昭和 年 月 日

## 6. 補正により増加する発明の数

## 7. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄

## 8. 補正の内容

別紙のとおり

## 6. 添付書類の目録

(1) 願書 1通 (4) 委任状及其の訳文 各1通  
(2) 明細書 1通 (5) 優先権証明書及其の訳文 各1通  
(3) 図面 1通 (6) 1通

## 7. 前記以外の発明者、特許出願人または代理人

## (1) 発明者

住所 スイス国ミュンヘンシュタイン、エミル、  
フライシュトラーセ 170  
氏名 フィリップ、ラシーヌ  
住所 スイス国テルクイル、タイヒシュトラーセ  
74  
氏名 ペテル、シュレプフェル

## (2) 出願人

## (3) 代理人

住所 東京都千代田区大手町二丁目2番1号  
新大手町ビルディング 331  
電話 (211) 3651 (代表)  
氏名 (6669) 弁理士 浅村 皓  
住所 同 所  
氏名 (6133) 弁理士 和田 義寛  
住所 同 所  
氏名 (6772) 弁理士 西 立 人

## (1) 明細書第4頁下から5行

「吸素」を「摩素」に訂正する。